

**REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR**



**Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz"
Facultad de Ciencias Agropecuarias**

Tesis en opción al título de Máster en Diagnóstico Veterinario

**REDES NEURONALES EN LA ASOCIACIÓN DE VARIABLES ZOOTÉCNICAS
CON LA INFESTACIÓN POR *FASCIOLA HEPATICA* EN REBAÑOS LECHEROS**

Autora: DMV Diamela Sánchez Moret.

Tutor: Lic. Amilcar Arenal Cruz; DrC.

Camagüey 2016

RESUMEN

La fasciolosis, es una enfermedad zoonótica parasitaria, ocasionada por la *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*. La misma provoca altas pérdidas en la industria ganadera. Las técnicas basadas en la detección de anticuerpos constituyen una alternativa no invasiva para el diagnóstico de la fasciolosis. El objetivo del presente trabajo es evaluar a través de redes neuronales, la asociación de variables zootécnicas y la infestación de *F. hepatica* en rebaños lecheros del municipio Vertientes. Se tomaron muestras de leche de 74 unidades; donde se aplicó un cuestionario para la caracterización de las variables productivas. Los niveles de anticuerpos anti *Fasciola hepatica* se determinaron a través del ensayo inmunoenzimático (ELISA). El 36,5 % de las unidades, presentaron valores de densidad óptica relativa (ODR) superiores a 0,6; lo cual indica que tienen afectación en la producción de leche por vaca por año. En el modelo de redes neuronales las variables de mayor importancia asociadas a la presencia de títulos de anticuerpos en el rebaño fueron la frecuencia de pastoreo en lluvia, la rehabilitación del pasto y el alimento complementario en lluvia. La disminución de la producción de leche por vacas por año está afectada por la infestación por *Fasciola hepatica*.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, rebaño lechero, ELISA, ODR, Redes Neuronales.

ABSTRACT

Fasciolosis is a parasitic zoonotic disease caused by *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. It causes high losses in the cattle industry. Techniques based on the detection of antibodies constitute a noninvasive alternative for the diagnosis of fascioliasis. The aim of this study was to evaluate through neural networks, association of variables husbandry and infestation of *F. hepatica* in dairy herds in the municipality Flowing. Milk samples were taken of 74 farms; a questionnaire for the characterization of productive variables was applied. Anti *Fasciola hepatica* antibodies were detected via enzyme immunoassay (ELISA). The 36.5% of the farms had values of relative optical density (ODR) greater than 0.6; which indicates that the production of milk per cow per year is affected by the *F. hepatica* infection. The neural network model shows that the most important variables associated with the presence of *F. hepatica* in the herd were grazing time in rain, rehabilitation of pasture and supplementary food in raining season. The results indicate that the milk production per cow per year is affected by the infestation by *Fasciola hepatica*.

Keywords: *Fasciola hepatica*, dairy cattle, ELISA, optical density relative, Neural Network.

TABLA DE CONTENIDOS

Pág.

RESUMEN	I
ABSTRACT	I
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	III
1. INTRODUCCIÓN	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 Concepto	8
2.2. Historia	8
2.2 Distribución Geográfica	9
2.1 Importancia de la Fasciolosis	9
2.4.1 Etiología	11
2.3 - Morfología	12
2.4.5 Ciclo biológico de la <i>Fasciola hepatica</i>	13
2.4 Epidemiología	15
2.4.2 Especies Susceptibles	15
2.4.3 Hospedero intermediario	15
2.4.4 Hospedero definitivo	16
2.7 Diagnóstico de la Fasciolosis	18
2.7.1 Diagnóstico clínico	19
2.7.2 Diagnóstico coprológico	19
2.7.3 Examen post-mortem del animal.	21

2.7.4 Diagnóstico inmunológico	22
2.8 Incidencia clínica en humanos.	24
2.6 Lucha y control	25
3.MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Localización e información sobre le recogida	26
3.1.1 Estudio del área	26
3.1.2 Vegetación	26
3.2 Procedimientos para la recolección de información	27
3.3 Toma de muestras	27
3.4 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	27
3.5 Análisis estadísticos	28
3.5.1 Red neuronal artificial	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5. CONCLUSIONES	46
6. RECOMENDACIONES	47
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
G	Gravedad
ODR	Relación de Densidad óptica
Kg/vacas	Kilogramos por vacas
IgG	Inmunoglobulina G
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

1. Introducción

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de gran impacto económico que afecta en su mayoría a los rumiantes domésticos causada por los trematodos *Fasciola hepatica* o *Fasciola gigantica*. La primera se encuentra distribuida en Europa, Asia, Oriente Medio y Latinoamérica, la segunda ha sido reportada en Asia, África y Hawai, además de los perjuicios económicos que ocasiona en el sector ganadero, es una zoonosis infecciosa parasitaria. (Marcos *et al.*; 2007). Específicamente, se clasifica dentro de las antropozoonosis y, según su modo de transmisión, es una metazoonosis. Se trata de un ejemplo característico de parasitosis emergente como consecuencia del cambio climático y del efecto del hombre (Mas-Coma, Bargues, Valero, 2005; Martínez-Valladares *et al.*, 2013).

Esta parasitosis representa un grave problema de salud animal, reportándose que existen 300 millones de bovinos y 250 millones de ovinos en riesgo de ser afectados (López-Lemes *et al.*, 2005).

Las pérdidas mundiales en la productividad animal debido a la fasciolosis se estiman en US\$ 3,200 millones por año , con un total de 600 millones de animales infestados de las comunidades rurales agrícolas y de los productores comerciales .

En Cuba, la fasciolosis es enzoótica del ganado bovino, constituyendo uno de los problemas más emergentes a resolver en la ganadería nacional. Se ha demostrado que el 35% de las pérdidas en el ganado adulto está ocasionado por la *F. hepatica*, y donde la pérdida por decomiso de hígados, tanto en la losa sanitaria como en el matadero, llega a ser del 70%. El Instituto de Medicina

Veterinaria, como institución rectora del trabajo veterinario en Cuba (IMV, 2007), reportó una infestación alta en bovinos, con una existencia de 1170 focos, 66 969 enfermos y 3059 muertos.

Se reportan pérdidas económicas catalogadas de cuantiosas (436 656 USD) por el decomiso de hígados en el 18,0 % de los 273 450 animales sacrificados en un período de 5 años en varias provincias de nuestro país (Brito 2010).

En la actualidad se describen innumerables métodos de diagnóstico más sensibles y específicos que las técnicas tradicionales, las cuales consisten en detectar anticuerpos específicos de *F. hepatica* en suero, jugos de carne y leche . Dentro de los métodos más confiables de inmunodiagnóstico, debido a su fácil manejo, alta sensibilidad y especificidad, se encuentran las pruebas inmunoenzimáticas; la más importante es la técnica de ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay), la cual se utiliza para la detección de anticuerpos y antígenos (ELISA indirecto) .

Actualmente, se comercializan pruebas inmunodiagnósticas para detectar la presencia de anticuerpos que reconocen *Fasciola hepatica* en suero, leche y jugos de carne (SVANOVIR^R *F hepatica*-Ab, Svanova Biotech, uppsala). La disponibilidad y facilidad de estos ensayos comerciales permiten realizar extensos estudios epidemiológicos .

La determinación de anticuerpos específicos a nivel de leche permite desarrollar métodos rentables para supervisar el estado de infestación del ganado lechero, efectuado por una herramienta de diagnóstico para el descubrimiento del índice parasitario con nematodos gastrointestinales y así reducir las pérdidas en la

productividad . Permite demostrar una correlación positiva entre el predominio del nivel de anticuerpos específicos para *Fasciola hepatica* y el suero de leche del ganado .

Problema de Investigación

No existe evidencia del efecto de la asociación de las variables de manejo zootécnicos en la infestación por *Fasciola hepatica* en los rebaños lecheros del municipio Vertientes.

Hipótesis de la Investigación

Si se determina el nivel de infestación por *Fasciola hepatica* en los rebaños lecheros del municipio Vertientes, entonces se puede evaluar a través de redes neuronales, la asociación de las variables de manejo zootécnico con la infestación del parásito.

Objetivo General

Evaluar a través de redes neuronales, la asociación de variables zootécnicas y la infestación de *F. hepatica* en rebaños lecheros del municipio Vertientes.

Objetivos específicos

1. Determinar la infestación por *F. hepatica* a través de títulos de anticuerpos en leche mediante ELISA, en rebaños lecheros del municipio Vertientes.
2. Evaluar la asociación entre los niveles de anticuerpos anti *F. hepatica* (ODR) y el rendimiento lácteo en unidades del municipio Vertientes.

3. Analizar a través de redes neuronales, la asociación de las variables productivas en la infestación por *F. hepatica* en rebaños lecheros del municipio Vertientes.

Beneficios esperados

Por primera vez se realiza un estudio de asociación de las variables de manejo zootécnico con la producción de leche y la infestación de *F. hepatica* en rebaños lecheros del municipio Vertientes.

Utilidad práctica

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es un método fácil de realizar, que permite analizar simultáneamente un gran número con ahorro de tiempo y que resulta muy útil para evaluar la infestación por *F. hepatica* en rebaños lecheros.

2. Revisión bibliográfica

2.1 Concepto

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria (helmintiasis) causada por dos especies de trematodos digéneos, *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, conocidas vulgarmente como duelas del hígado. Los adultos se localizan en la vesícula biliar o en los conductos biliares del hígado .

2.2. Historia

Fasciola hepatica fue el primer trematodo descrito para la ciencia; fue Jehan De Brie quien en **1379** vio al parásito en el hígado de un ovino y relacionó su presencia con el consumo de una hierba llamada dauve, de donde derivó el nombre de duela del hígado.(Carvalho O y Jannotti L.,2008).

Posteriormente, Gesner demostró en **1551** que la duela del hígado se encontraba allí donde el ganado vacuno comía hierba en las proximidades de agua y, en **1883**, Leuckart, de Alemania, y Thomas, de Inglaterra, que investigaban por separado, describieron el ciclo de vida completo.

Históricamente, este parásito ha recibido diversas denominaciones, como: “caquexia acuosa”, “podredumbre del hígado”, “comalía”, “papo”, “papuza” o “mal del hígado”; y el parásito, por su parte, se conoce con los nombres de “coscojo”, “caracolillo”, “palomita”, “galápago”, “gálamo”, “sapillo”, “duela

hepática” o “distoma del hígado” (Arroyo,R., Mora,J.,Molina,S.,Troper, y Amador A., 1981; Rojo-Vázquez y Gómez-Bautista, 1989; Díez Baños, 2011) aunque en la actualidad sus acepciones más comunes son Fasciola o duela hepatica.

2.2 Distribución Geográfica

Es una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita. La especie más común, *Fasciola hepatica*, es hermafrodita y utiliza moluscos del género *Limnaea* como hospedero intermediario (Pérez-García, Álvarez-Sánchez, Mainar-Jaime, y Rojo-Vázquez, 2002). Se estima que en el mundo existen más de 550 millones de animales expuestos a la distomatosis hepática, con las consiguientes pérdidas que provoca, el rechazo total o parcial de hígados en los mataderos y su considerable impacto negativo en el potencial productivo de los animales afectados(Drugueri, 2005). Es importante remarcar que la fasciolosis es la enfermedad de transmisión vectorial que presenta la más amplia distribución latitudinal, longitudinal y altitudinal (Mas-Coma, Valero, y Bargues, 2008).

2.1 Importancia de la Fasciolosis

La [ganadería](#) mundial reporta grandes pérdidas por los daños que ocasiona esta parasitosis, teniendo en la actualidad gran importancia epidemiológica y zootécnica perfectamente estudiada y documentada donde se demuestra la importancia en cuanto al impacto producido por esta, sobre todo en el ganado bovino, ovino-caprino, reportándose cifras de 250 millones de ovinos y 300 millones de bovinos potencialmente infestados por esta entidad . Además de las

pérdidas económicas que superan los tres millones de dólares anuales a nivel mundial

En Cuba, durante el último decenio, la infestación por *Fasciola hepatica* se ha incrementado. En 1992, en mataderos, la tasa de hígados afectados fue de 9,5 % y ascendió a 37,5 % en el 2000. La tendencia es a seguir aumentando por no aplicarse correctamente el programa de prevención. Actualmente la situación de la enfermedad se considera crítica al no disponerse de los fasciolicidas requeridos. Aunque existe una gama de medicamentos de alto costo que constituyen una barrera obstaculizadora del uso a gran escala por los criadores de ganado en los países subdesarrollados y Cuba no es la excepción . En los vacunos, las pérdidas en producción por fasciolosis pasan generalmente inadvertidas, debido a que el curso de la enfermedad es lento. La fasciolosis influye sobre la producción de leche pudiéndose afectar hasta en un 30%. También trae consigo retraso en el crecimiento y mala conversión alimenticia siendo las pérdidas en este sentido entre un 30 y 50%, pérdida de peso, pérdidas económicas por decomiso de hígados a nivel de matadero, además pueden añadirse trastornos reproductivos y efectos sinérgicos así como los gastos originados por el control tanto del hospedero intermediario como del parásito y, problemas de salud pública en humanos (Rojas L, Vazquez A, Domenech I, Robertson L., 2010). (figura1).



Figura 1. **Fasciola adulta en hígado bovino.**

Fuente: <http://veterinariosdemexico.com/la-fasciola-hepatica>

2.4.1 Etiología

Taxonómicamente se clasifica al agente causal de la Distomatosis de la siguiente manera:

Phylum: Platyhelminthes.

Clase: Trematoda.

Sub-Clase: Digenea.

Orden: Fasciolata.

Familia: Fasciolidae.

Especies: *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*.

La especie gigantea es más grande y de áreas tropicales, mientras que la *Fasciola hepatica* es más chica y cosmopolita. En América la única que existe de estas dos especies es la hepática. El ciclo biológico es complejo e indirecto, o sea, para poder realizar el ciclo la *Fasciola hepatica* necesita la presencia de hospedadores intermediarios, dentro de los cuales se reproducen algunos de los

estadios juveniles del trematodo. Los hospederos intermediarios (caracoles) miden entre 0,5 y 1 cm, son de color pardo oscuro y el caparazón tiene de 2 a 5 espirales (Vázquez, A., Sánchez, J., Pointier, J.P., Théron, A., y Hurtrez-Boussès, S., 2013).

2.3 - Morfología

Fasciola hepatica es un trematodo hematófago hermafrodita, aplanado dorsoventralmente, de forma folácea y color café parduzco. Puede alcanzar medidas de 2 a 3 cm de largo por 1 cm de ancho (Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A.M. y Jennigs, F. W, 2001). Su superficie corporal es un tegumento cubierto de espinas a modo de púas dirigidas hacia atrás, que se disponen en hileras transversales sobre la superficie ventral hasta la mitad de la cara dorsal del parásito (Rojas, 2004; Urquhart *et al*, 2001; Carrada, 2007). En su extremo anterior se encuentra una porción cefálica de 3-4 mm de longitud, donde se ubica la boca la cual está rodeada por la ventosa oral aproximadamente 1 mm de longitud. Después de la porción cefálica, el parásito presenta un ensanchamiento en forma de hombros y a este nivel se encuentra la ventosa ventral, la cual le sirve para fijarse a las paredes de los conductos biliares. Entre estas dos ventosas se abre el poro genital, el que se identifica por la convergencia de los tractos reproductores masculino y femenino. . El aparato genital masculino, ocupa la parte medial del cuerpo, está formado por dos testículos bifurcados que desembocan en la bolsa del cirro; el poro genital se ubica en el borde acetabular anterior sobre la línea media. El aparato genital

femenino, consta de un ovario ramificado, situado al lado derecho, delante de los testículos; el útero se ubica en el tercio anterior y es corto .

El cuerpo continúa ensanchando pero a partir del primer tercio se estrecha para terminar en forma roma (Cordero del Campillo *et al.*, 1990; Bowman, Linne, y Eberhard, 2004)

2.4.5 Ciclo biológico de la *Fasciola hepatica*

Los huevos abandonan el hospedador definitivo con las heces. De los huevos eclosionan larvas ciliadas miracidio. En las heces los huevos no se desarrollan por lo que requieren ser dispersados en el agua y bajo estas condiciones pueden supervivir varios meses, aunque la sequedad los destruye fácilmente (Leguía, 1991; Quiroz, 2000). Las larvas miracidio penetran en el hospedador intermediario, un caracol de agua dulce. En el interior del caracol, las larvas miracidio se transforman en esporocistos que se desarrollan en redias y éstas en cercarías. Las cercarias abandonan el caracol y, tras un periodo de vida libre en el agua se enquistan sobre plantas acuáticas, transformándose en metacercarias. Las metacercarias son ingeridas por el ganado, los hospedadores definitivos que se desenquistan en el duodeno .Del duodeno pasan a los conductos biliares, donde originan los adultos que producirán huevos que abandonarán el hospedador y cerrarán el ciclo. (figura 2) (Sakaguchi, Y., 1980.)

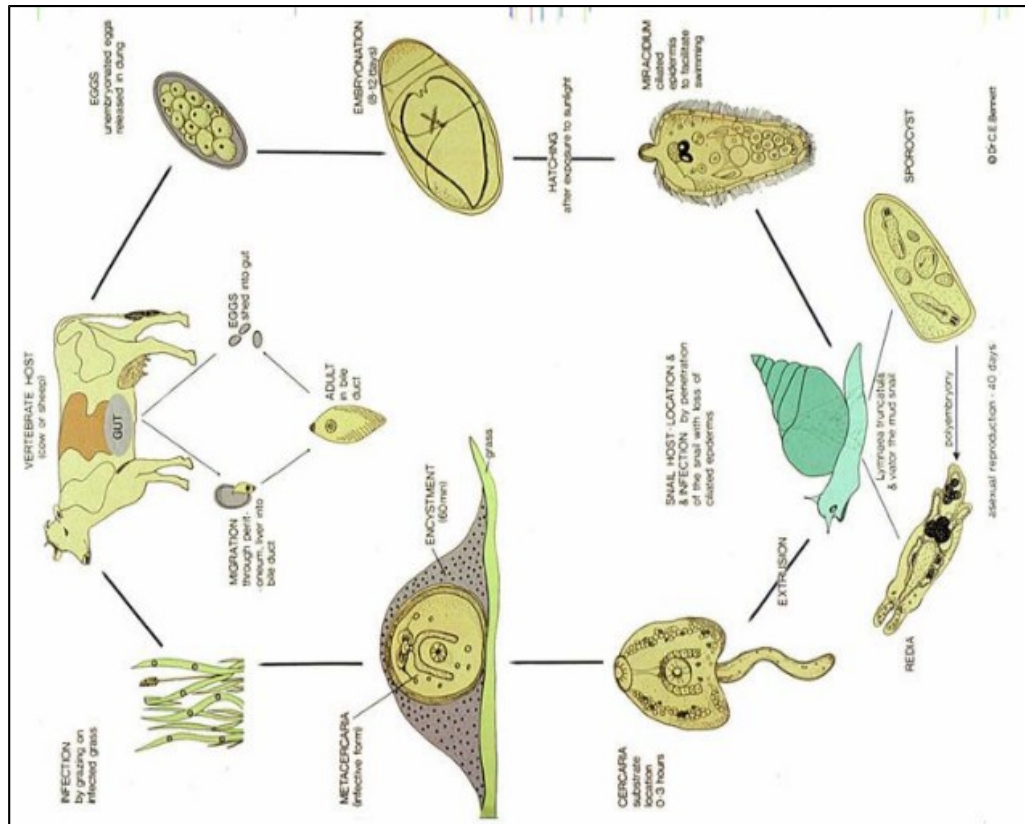


Figura 2. Ciclo biológico de la *Fasciola hepatica*

Fuente: <http://noticiaspecuarias.bligoo.com/la-fasciola-hepatica>

El potencial biótico reproductivo es enorme. Considérese que a partir de un solo huevo fértil se producirán miles de formas infectantes, las que se distribuyen por las acequias y canales de riego, quedando adheridas sobre las hojas de los berros, lechugas, alfalfa y otras plantas acuáticas, contaminándose también las praderas, los pastizales, el agua para beber o regadío y, finalmente, el ganado y los seres humanos .

2.4 Epidemiología

2.4.2 Especies Susceptibles

La *Fasciola hepatica* es capaz de vivir en numerosos hospedadores, aunque los más específicos son los rumiantes (vaca, oveja, cabra, búfalos, ciervos, antílopes, camellos, dromedarios, etc). Los équidos también son receptivos como lo son los cerdos y jabalíes, lagomorfos (conejos y liebres), roedores, carnívoros marsupiales e incluso el hombre. Finalmente los ovinos, los caprinos y los bovinos son los más receptivos al parásito .

2.4.3 Hospedero intermediario

Los hospederos intermediarios de la *F. hepatica* son los moluscos pulmonados de agua dulce que pertenecen a la familia Lymnaeidae, son de color pardo grisáceo, cónicos y su tamaño varía de 1 a 10 mm, se caracterizan por tener una concha helicoidal ovalada que se enrolla en plano vertical y hacia la derecha, lo que le confiere la denominación de dextrógira, además, presentan un peristoma simple y carecen de opérculo (Leguía, 1991)

Se desarrollan en terrenos con humedad permanente (manantiales), así como en aguas poco profundas y renovables (Barriga, 2002). Son hermafroditas y un solo caracol puede producir hasta 25,000 descendientes en condiciones de temperatura y humedad ambiental adecuadas. Pueden hibernar enterrándose en el subsuelo húmedo y sobrevivir hasta por un año cuando las condiciones climáticas son desfavorables (Leguía, 1991). En los meses de verano (julio, agosto, septiembre) se observan limitaciones de la reproducción de los

caracoles [producto](#) de la intensa [radiación](#) solar, la [temperatura](#) del agua en los biotopos durante el día llega hasta 45-50 grados centígrados; en los meses de octubre, noviembre y diciembre las lluvias son más continuadas y las temperaturas más favorables para su desarrollo. Las excesivas lluvias imperantes en determinadas épocas del año ejercen un efecto negativo por el arrastre de los caracoles, de sus huevos y del sustrato del que se alimentan .

2.4.4 Hospedero definitivo

La *Fasciola hepatica* tiene una amplia variedad de hospederos definitivos (incluido el hombre) en los que figuran mamíferos domésticos de importancia ganadera como bovinos, ovinos, camélidos, caballos, burros, cabras, cerdos, cuyes y conejos ([Cordero de Campillo et al., 2002](#)).

2.5. Formas clínicas de la Fasciolosis y síntomas

La fasciolosis presenta tres formas clínicas: aguda, subaguda y crónica siendo la forma crónica la más frecuente; se basan principalmente en los hallazgos de necropsia y depende de la cantidad de vermes adultos, de los parásitos inmaduros migrantes en el parénquima hepático y de la actividad hematófaga de los adultos en los conductos biliares .

La fasciolosis aguda se produce luego que el animal ha ingerido grandes cantidades de metacercarias en un período corto de tiempo, tratándose de una hepatitis traumática, ocasionada por la migración masiva de fasciolas inmaduras precoces (1-4 semanas) a través del parénquima hepático y desarrollándose una anemia hemorrágica aguda, lo que puede ocasionar la muerte súbita sin

manifestaciones clínicas aparentes. Si el proceso se manifestara clínicamente, el animal puede presentar: debilidad general, letargia, falta de apetito, disnea, palidez de las mucosa, dolor abdominal, en ciertos casos ascitis y hepatomegalia. El cuadro y la muerte se producen con rapidez (1 a 2 días), las cuales suelen ser acompañadas con la eliminación de secreciones sanguinolentas por el ano y la nariz (Leguía, 1991; Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, C.D. y Hinchcliff, K. W., 2002). Se observa principalmente hacia el final del verano, cuando pasan a la hierba gran cantidad de cercarias (Soulsby, 1993; Leguía, 1991; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999).

Es un tipo de presentación intermedia, que se produce cuando los animales ingieren grandes cantidades de metacercarias en un periodo de tiempo más prolongado que el anterior caso, debido a que los vermes inmaduros migran y realizan una acción traumática, se desarrolla una anemia hemorrágica de presentación gradual. Los signos clínicos incluyen: palidez de las membranas mucosas, anorexia, adelgazamiento, dolor a la palpación de zona hepática, ascitis y en menor porcentaje se observa casos de edema submandibular (Leguía, 1991; Radostits *et al.*, 2002).

La parasitosis crónica se produce a consecuencia de un efecto acumulativo a través del tiempo, debido a que el animal ingiere una cantidad pequeña de metacercarias durante largos períodos. Es una forma bastante frecuente en animales de abasto como ovinos y bovinos (pudiendo estos últimos soportar una mayor carga parasitaria sin manifestaciones clínicas importantes), además de otros animales y el hombre (Acha y Szyfres, 2003).

Los parásitos se establecen en los canalículos biliares produciendo un engrosamiento, fibrosis y obstrucción de ellos (etapa patente de la infección). En esta ubicación el verme en un estado maduro, elimina huevos por la bilis los que aparecerán en las heces, lo cual permite realizar el diagnóstico coprológico para los individuos que presenten un cuadro crónico. La [anemia](#) generalmente es intensa y las mucosas aparecen extremadamente pálidas. Aunque pueden producirse muertes, muchas solamente presentan una baja [productividad](#) cuando la carga parasitaria es baja. Exteriormente se observa pérdida de peso, edema submandibular y palidez de las mucosas por varias semanas; en terneros también hay caquexia, anemia y diarrea crónica .

2.7 Diagnóstico de la Fasciolosis

Los síntomas de la fasciolosis están siempre asociados a la dosis infecciosa (cantidad de metacercarias ingeridas) (Moreira *et al.*, 2012). Por todo lo anterior es necesario hacer un diagnóstico adecuado, previo a la introducción de animales provenientes de zonas contaminadas, e incluso se debe recomendar no suministrar pastos de corte provenientes de esos lugares debido a la alta probabilidad de que venga contaminado con metacercarias enquistadas (Fox *et al.*, 2011).

Para el diagnóstico de fasciolosis se cuenta con diferentes métodos o técnicas como: coprológicas, inmunológicas, hallazgo directo por cirugía y necropsia de animales, entre otras. Se debe tener en cuenta la etapa de infección en la que se encuentra el animal y la sintomatología clínica observada.

2.7.1 Diagnóstico clínico

La observación de los signos en cada una de las formas clínicas (aguda, subaguda y crónica) de la fasciolosis es indispensable para realizar una correcta anamnesis del proceso patológico. Se han descrito con anterioridad signos como la palidez de las mucosas, la ictericia, la letargia y marginación del individuo respecto del rebaño, la depresión, la disminución del apetito y de la condición corporal, el posible edema submandibular, la ascitis, el dolor a la palpación abdominal, la debilidad general, etc. También hay que considerar la época de aparición de tales signos, puesto que este hecho podrá ayudar a delimitar el curso clínico (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

En la actualidad, las técnicas no invasivas basadas en el diagnóstico por imagen, principalmente la ecografía, están adquiriendo una especial relevancia para la determinación de las lesiones hepáticas y del propio parásito (Richter, J., Freise, S., Mull, R. y Millán, J, 1999). Entre otras, también se encuentran la tomografía axial computarizada y la resonancia magnética nuclear (Gonzalo-Orden *et al.*, 2003).

2.7.2 Diagnóstico coprológico

Este método carece de sensibilidad en la fase aguda de la infección, debido a que el parásito se encuentra migrando por el parénquima hepático sin llegar a la madurez sexual, por lo que los exámenes parasitológicos son negativos a la presencia de huevos. Por otro lado, durante la fase patente, la intermitencia en la expulsión de los huevos hace que también se presenten dificultades en el diagnóstico coprológico, por lo que se requiere de exámenes seriados (Carrada, 2003; Doménech, C.I., Marcet, S.R., Figueredo, P.M. y Sarracent, P.J., 2009).

- Técnica de sedimentación

Estos métodos son los más usados, se usan para diagnósticos cualitativos y cuantitativos, aprovechando el peso específico de los huevos de tremátodos que es mayor que el del agua y la velocidad de sedimentación que es de 10 mm por minuto, mucho mayor que la de los restos de las materias fecales (Parffit, 1970; Conceição, M., Durão, R., Costa, I. y Correia, J., 2002). Debido a que no se detectan formas prepatentes de infección, esta técnica no resulta ser 100% eficaz ni refleja el 100% de animales infectados, teniendo porcentaje significativo de falsos negativos (Quiroz, 2000). Su uso resulta limitado en hospedadores infectados con pocos tremátodos o que se encuentran en periodo de invasión, Este examen coprológico toma en promedio 20 minutos por muestra, lo que resulta mayor al tiempo empleado con técnicas serológicas (Girão y Ueno, 1985; Gorman, T., Moreno, P., Lorca, M., Ibarra, L. y Alcaíno, H., 1991; Quiroz, 2000). La sensibilidad de la sedimentación como técnica se puede aumentar con el empleo del método de tamiz de agitación (66,7 %) (Anderson et al., 1999); también por el incremento del peso de la muestra fecal (a partir de 43 % de 4 g a 64 % para 10 g) (Charlier, De Meulemeester, Claerebout, Williams, y Vercruysse, 2008); y se puede repetir el examen en la misma muestra (a partir de 69 % para el primer examen a 91,9 % si el método se repitió tres veces) (Rapsch et al., 2006).

El método de Kato-Katz es simple y ampliamente utilizado en las muestras de heces humanas y también se ha aplicado para la detección de huevos de trematodos; tanto la sedimentación y como el método de Kato-Katz se pueden

utilizar para la evaluar cualitativa y cuantitativamente la presencia de huevos de *Fasciola sp.* en heces de humanos (Levecke *et al.*, 2011).

-Técnica de flotación

Esta técnica necesita adicionar soluciones de alta densidad como son: sulfato de zinc saturado o yodo mercurato de potasio, ya que los huevos de fasciolas por lo general presentan alto peso molecular además resulta necesaria la evaluación de costo de insumos, así como los cuidados respecto a la corrosión y deformación de huevos. (Quiroz, 2000). Los métodos de flotación son cualitativos y los productos químicos utilizados son perjudiciales para el medio ambiente (Rinaldi, Coles, Maurelli, Musella, y Cringoli, 2011).

2.7.3 Examen post-mortem del animal.

Este procedimiento es fundamental para esclarecer la presencia de *F. hepatica* en el hospedador definitivo, en especial en los casos agudos de fasciolosis que hayan dado lugar a la muerte del animal. Las lesiones hepáticas y en otras localizaciones (ganglios linfáticos, páncreas, peritoneo,...) son muy variables dependiendo del individuo y de la dosis infectante, entre otros aspectos. Pueden observarse desde trayectos hemorrágicos hasta colangitis, flebitis de la vena portal, fibrosis, calcificación, formación de abscesos, cirrosis, hiperplasia hepática y de los ganglios linfáticos hepáticos. Aunque se ha comprobado que la distribución del infiltrado inflamatorio es similar en animales primo y reinfectados, las lesiones suelen ser de mayor intensidad en los segundos (Pérez *et al.*, 2005). La cápsula de Glisson se observa engrosada, al mismo tiempo se

observa hepatomegalia, hematomas, abscesos subcapsulares y necrosis. Puede encontrarse también formaciones nodulares y zonas con fibroesclerosis periductal y ensanchamiento de los conductos biliares intrahepáticos .

2.7.4 Diagnóstico inmunológico

Los métodos parasitológicos empleados para la detección de *F.hepatica* en el hígado o sus huevos en las heces tienen una especificidad muy alta y baja sensibilidad, lo que pudiera deberse que el parásito se encuentre en la fase de migración larvaria, a que presente migraciones aberrantes o exista una baja infestación en la que la producción de huevos es baja e irregular, por consiguiente el diagnóstico temprano no es posible porque no se encuentran los huevos en las fases hasta que alcance la madurez del parásito, normalmente entre 10 y 14 semanas después de la infestación. Un acercamiento alternativo, para superar las deficiencias del diagnóstico parasitológico está basado por la determinación de anticuerpos en suero para los antígenos específicos *Fasciola hepatica*; algunos autores describen varios métodos de mayor eficacia .

Se tienen las siguientes técnicas: inmunodifusión, inmunolectroforesis, contrainmunolectroforesis, ELISA y Western Blot.

En general, la técnica de elección en la actualidad es el enzimoimmunoensayo o ELISA indirecto utilizando antígenos de excreción-secreción para la detección de anticuerpos en suero sanguíneo (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). El test de ELISA tiene gran sensibilidad, especificidad, fiabilidad y reproducibilidad, pero su utilidad es mayor a nivel de rebaños infectados de manera natural antes que en el diagnóstico individual (Pfister, 1990).

Dentro de los protocolos de ELISA, la técnica de ELISA-sándwich que podría también clasificarse dentro de las pruebas directas (Piñeiro Fraga, 2013), es capaz de detectar la presencia de los antígenos del parásito durante la prepatencia, en muestras de suero desde la 1ª semana post-infección (Duménigo *et al.*, 1999; Almazán, C., Ávila, G., Quiroz, H., Ibarra, F y Ochoa, P., 2001) y en heces desde la 4ª (Duménigo *et al.*, 1999; Almazán *et al.*, 2001; Martínez-Pérez *et al.*, 2012) o siguientes semanas post-infección (Espino, A.M., Marcet, R. y Finlay, C.M. 1997; Moustafa, N.E., Hegab, M.H. y Hassan, M.M., 1998). Sin embargo, aunque con el ELISA indirecto se puede detectar la infección a partir de la 1ª (Arias *et al.*, 2006) o siguientes semanas post-infección (Santiago y Hillyer, 1988; Marín Gómez, 1992; Rodríguez, M., Rojas, J. y Gómez, V. 1998; Reichel, 2002; Mezo, M., González, M. y Ubeira, F.M., 2007), su problemática radica en que los títulos de anticuepos pueden mantenerse elevados durante meses una vez que ha concluido la infección y dar lugar a falsos positivos (Boulard, C., Bouvry, M. y Argente, G. ,1985; Estuningsih, S.E., Widjayanti, S., Adiwinata, G. y Piedrafita, D., 2004; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Por otro lado, con el ELISA indirecto pueden detectarse hasta un 10% de falsos negativos debido a la disminución de los niveles de anticuerpos al acceder el trematodo a los canalículos biliares y aislarse en cierta medida del sistema inmunitario del hospedador. (Molloy, J.B., Anderson, G.R., Fletcher, T.I., Landmann, J. y Knight, B.C., 2005; Opreescu *et al.*, 2010). El ELISA indirecto se usa como herramienta útil para el diagnóstico en detección de anticuerpos contra *Fasciola hepatica* en la leche y suero, brindando alta sensibilidad y

especificidad en ganado vacuno y ovino. Se observan ventajas de esta técnica respecto a otras técnicas serológicas, pues los estudios lo corroboran obteniéndose sensibilidades de 96.8, 74.2 y 47.6 % para Fas2-ELISA, Western blot y Arco 2, aunque el arco 2, posee una mayor especificidad (98.24%) frente al 91.2% de ELISA y 88.6% de Western Blot (Marcos *et al*, 2002).

2.8 Incidencia clínica en humanos.

La Fasciola hepatica adquiere una importancia considerable, debido al creciente número de casos humanos, los que pueden ser asintomáticos o mostrar cuadros graves e incluso localizaciones aberrantes en pulmón, ojo, cerebro, músculos y otros tejidos

Los humanos adquieren la enfermedad al consumir berros, alfalfa u otras hierbas o beber agua cruda de aguas estancadas, acequias o pozos, contaminados con las metacercarias de la fasciola (Marcos *et al.*, 2004, Carrada y Escamilla, 2005 y Valencia *et al.*, 2005).

La manifestación de los síntomas depende de la cantidad de fasciolas en el hígado, de ahí que hay casos asintomáticos cuando la carga parasitaria es baja, en cambio a mayor carga los síntomas son más manifiestos como anemia, dolor abdominal al hipocondrio derecho, cefalea, hepatomegalia, diarrea, escalofríos, náuseas y vómitos (Marcos, 2002; Fredes, 2004 y Carrada, 2005)

La fasciolosis humana no constituye un problema de salud pública en el territorio cubano debido a los avances en materia de educación higiénico sanitaria que ha alcanzado la población. Sin embargo, un brote epidémico puede ser posible por

la persistencia de la infección en animales y estar presentes los hospederos intermediarios. (Díaz R, Garcés M, Millán L, Pérez L, Millán JC, 2011)

Cuba es considerada un área hipoendémica por prevalencias menor que 1 %. El primer caso de infección humana fue notificado en Cuba en 1931 y para 1944, más de 100 nuevos casos habían sido identificados lo que representaba alrededor del 33% de las infecciones reconocidas para entonces a escala global. En la actualidad, casos esporádicos de fasciolosis por *F. hepatica* continúan siendo diagnosticados, particularmente en la región central y occidental del país. La incidencia anual es lo suficientemente baja como para que la parasitosis no sea considerada como un problema de salud en la isla (Rojas L, Vázquez A, Domenech I, Robertson L J, 2010).

2.6 Lucha y control

La fasciolosis es una enfermedad de gran impacto en salud pública, frente a la cual cada país debe instaurar medidas de prevención y control partiendo de conceptos tanto socioculturales, como biológicos y técnicos (Chalco Z, Edith Yesila 2011; Pulido V Adriana del Pilar, Castañeda S Rubiela, Arbelaez G, 2011). El control integrado de la fasciolosis debe combinar de forma racional diferentes métodos de lucha contra el parásito y sus hospederos intermediarios, sean tanto físicos, como químicos, biológicos, genéticos y naturales, en la búsqueda de las mejores alternativas, conjuntamente con el esfuerzo y la voluntad política de cada país (Lazo PL, Francos U, Milagro Calero I, Valdés MC, 2011).

3. Materiales y Métodos

3.1 Localización e información sobre la recogida

Se realizó el estudio en 74 unidades de producción lechera, pertenecientes a la Empresa Agropecuaria Vertientes.

3.1.1 Estudio del área

Su extensión territorial es de 2024,3 km² de ellos más de 80 km son de costas bajas y cenagosas, que se extienden desde el embarcadero de Santa María en la ensenada del mismo nombre, hasta el estero de Aguas Dulces. Constituye una llanura marina acumulativa baja (h: 0-5, 5-10m) con carso cubierta por gruesos depósitos areno - arcillosos, musgosos y tubosos, hacia la zona costera con los niveles más bajos, ocupa una franja continua inundada de carácter lacuno palustre.

Los suelos son Hidromórficos, pantanosos hacia la costa y más al norte se desarrollan gley amarillentos cuarcíticos y ferrolíticos, cuarcítico amarillo, rojizo lixiviado y asociados a los valles fluviales aparecen los vertizuelos. La precipitación media anual es de 1807,5 mm, que es la más alta de la provincia; la temperatura media es de 24,6 °C y la humedad media del 70%.

3.1.2 Vegetación

Toda la vegetación natural está limitada hacia las áreas bajas costeras donde existe el bosque de mangle y ciénaga. Hacia la parte septentrional de esta llanura se desarrolla la vegetación secundaria representada por bosques, matorrales y comunidades herbáceas, además áreas de cultivo de arroz y

[pastos](#). La hidrografía la conforman ríos, arroyos, embalses, lagunas y canales que se destacan por su importancia los ríos

.
Los datos sobre la información, ubicación y recogida de datos se observa en (Anexo 1).

3.2 Procedimientos para la recolección de información

Paralelo al trabajo de investigación se aplicó un cuestionario (Anexo 2), el cual se llenó en visitas que se realizaron a las unidades productoras y donde se entrevistaron a los jefes de unidad. A través de los cuales se obtuvo información para conocer el manejo zootécnico que se le realiza a las unidades que se incluyeron en la investigación; así como, las reales prácticas *in situ* que inciden o no en la perspectiva de la fasciolosis en el municipio Vertientes.

3.3 Toma de muestras

Para establecer el ELISA se utilizaron muestras de leche de las cantinas de las 74 unidades, en horas tempranas de la mañana (5:30 a.m-8:00a.m). Se trasladaron al laboratorio de la facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad de Camagüey, en neveras refrigeradas, se centrifugaron por 15 min a 12000 x g, se tomaron los sueros y se almacenaron en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

3.4 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se emplearon placas de microtitulación de poliestireno Polisorb de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca), previamente recubiertas con antígenos de proteínas de

excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (Sanovir, Bélgica). Se depositaron 100 µL por pocillo de cada suero y siempre por duplicado. Se incubó durante una hora a 37 °C. La inmunorreactividad con las proteínas de *Fasciola hepatica*, se determinó por la reacción coloreada del conjugado con el cromógeno o-fenilendiamina (OPD; Sigma, EE.UU.). La relación óptica en cada caso (ODR), (Sanovir *F.hepatica-Ab kit*) se determinó a través de la fórmula:

$$ODR = \frac{\text{Densidad Óptica de la muestra} - \text{Densidad Óptica del control negativo}}{\text{Densidad Óptica del control positivo} - \text{Densidad Óptica del control negativo}}$$

El ELISA cuantifica los anticuerpos dirigidos a los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* y los resultados se expresan como una relación de densidad óptica (ODR). Se compararon los resultados obtenidos, con los parámetros referidos en el Kit (Sanovir *F. hepatica ab-Kit*).

La interpretación de los resultados se realizó según las especificaciones del productor: ODR de 0,3 o más bajo ausencia de infección, 0,3-0,6 contacto con el parásito pero sin afectar la producción de leche y un ODR por encima de 0,6 para altos niveles de infección con pérdidas de producción asociadas.

3.5 Análisis estadísticos

Se realizó un modelo de regresión lineal entre ODR y el rendimiento. Las diferencias de ODR entre las variables se analizaron mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y en caso significativo se procedió con la prueba de comparación de medias (Student-Newman-Keuls).

3.5.1 Red neuronal artificial

Se empleó una red neuronal artificial del tipo MLP (multilayer perceptron). La red se estructuró con 15 factores (tipo de producción, producción total, disponibilidad del pasto en lluvia y en sequía, alimento complementario en lluvia y en sequía, rehabilitación del pasto, rotación de animales, desparasitación, fuente de agua, pastoreo con otras especies, carga, frecuencia de chapea y tiempo de pastoreo en lluvia y sequía); con una capa intermedia y una capa de salida con una neurona. Se utilizó una función de activación sigmoideal. En el entrenamiento, se utilizó el método de retro-propagación, con una tasa de aprendizaje de 0,4 y el impulso de 0,9. Para el entrenamiento se empleó el 70% de los datos y se probó con el 20% de los demás datos y se validó con el resto de los valores. El criterio de parar fue de 1 ciclo sin disminución en el error. Los análisis se realizaron en SPSS v 21.0 (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.).

4. Resultados y Discusión

El rendimiento medio de la producción láctea, de las unidades en el año 2014 fue de 1002,85 kilogramos de leche por vacas (figura 3). Esta media de producción es menor que la obtenida por estas unidades en el año 2013, la cual fue de 1348 kilogramos de leche por vacas.

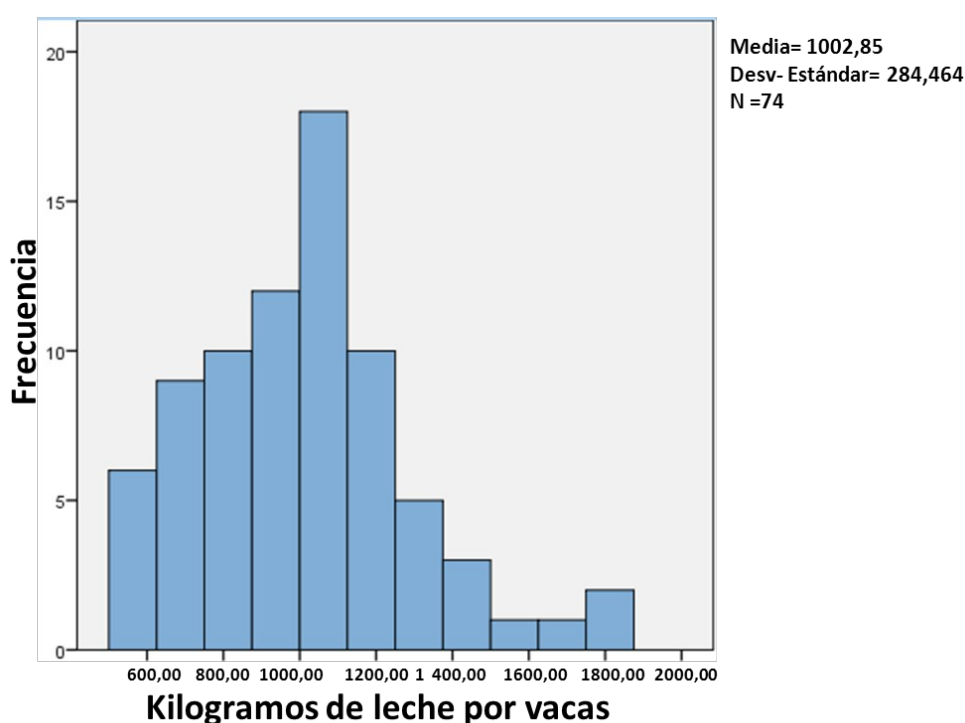


Figura 3. Distribución de la frecuencia con la producción de leche.

El 36,5% de las unidades presentaron valores de ODR superiores a 0,6; lo cual indica la presencia del parásito en el rebaño provoca pérdidas en la producción de leche (figura 4).

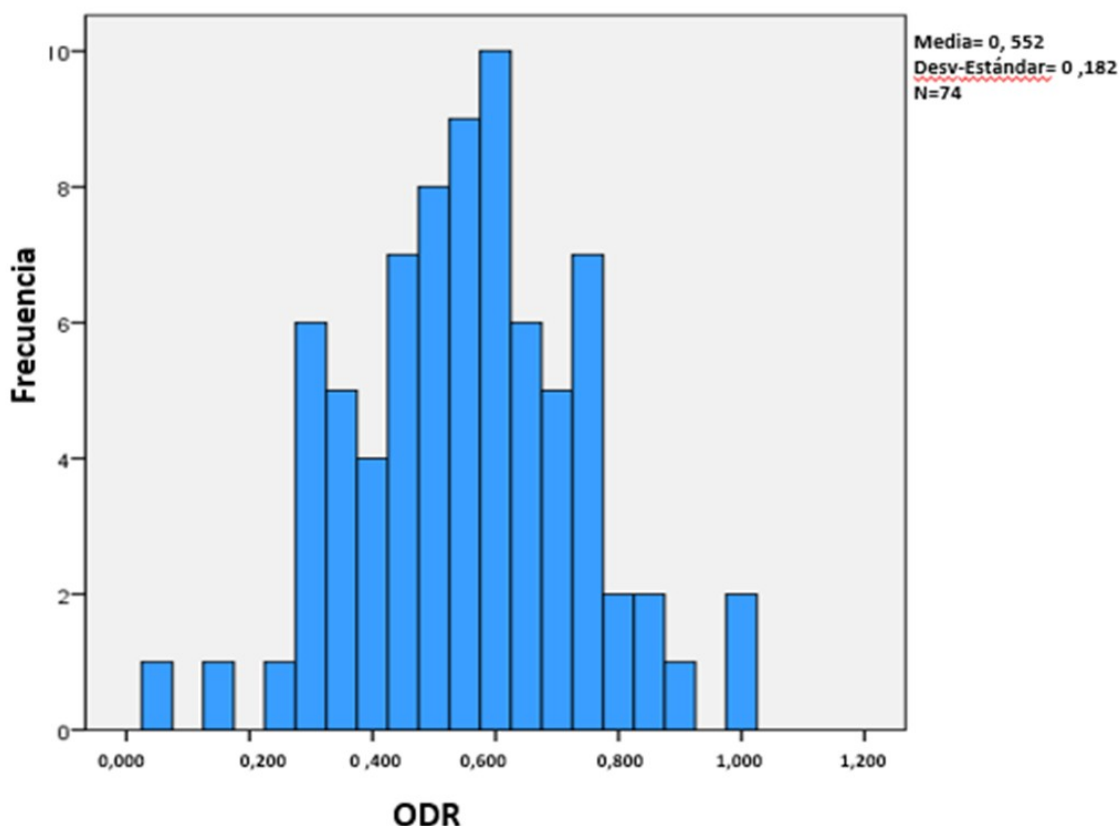


Figura 4. Distribución de frecuencia de los niveles de anticuerpos anti *Fasciola hepatica* (ODR) en muestras de leche en 74 unidades en el municipios de Vertientes .

La prevalencia de *F. hepatica* del rebaño en estudio fue de 84,5 %. Este resultado fue inferior al obtenido en investigación paralela realizada en igual período de tiempo, en el municipio de Camagüey, en el que se detectó una prevalencia del 90 % y en Jimaguayu del 92,5 %. Valores inferiores se informaron en Bélgica con una prevalencia del 37 %, también en una investigación que analizaron muestras de leche; mientras que en Alemania fue de 23,6 %.(Bennema 2010 y Kuerpick 2013).

La relación entre los niveles de anticuerpos anti *F. hepatica* (ODR) y la producción de vaca por año en unidades del municipio de Vertientes (figura 5). La regresión lineal negativa entre el ODR y la producción de leche. El 10 % de la variación de la producción, se explica por la ecuación ($\text{kg/vaca/año} = 1127 - 493 \times \text{ODR}$) por el nivel de anticuerpo de *Fasciola hepatica*. La producción de leche se afecta al incrementarse los niveles de ODR.

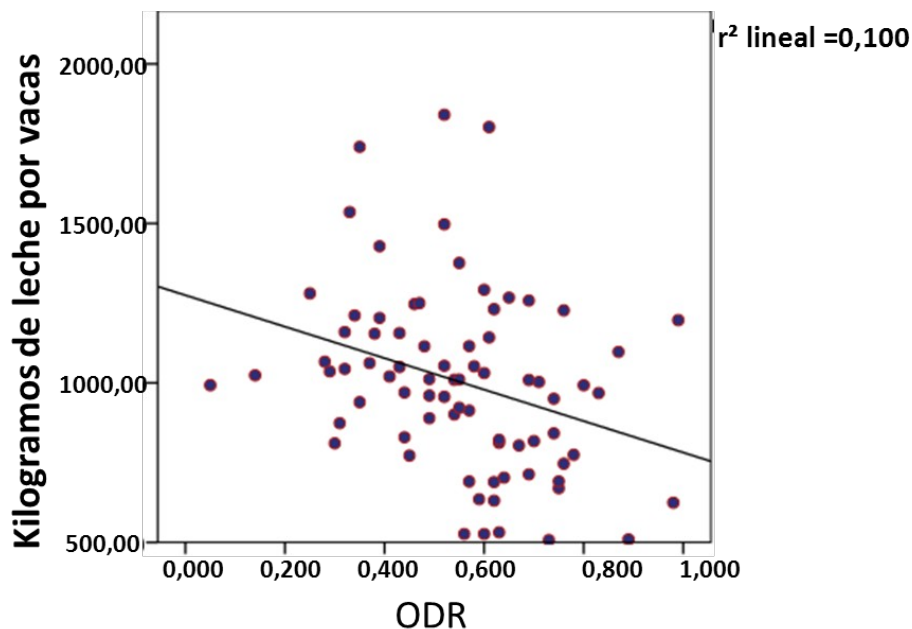


Figura 5. Relación entre el ODR y la producción (kilogramos de leche por vacas).

El por ciento de variación de la producción de leche, en nuestra investigación fue superior al informado en estudio realizado en Bélgica en un rebaño de 606 animales altamente productoras de leche donde la variación de la producción fue del 8-15 % (Howell, Baylis, Smith, Pinchbeck, Williams, 2015).

Las pérdidas de la producción por vaca por año en el presente trabajo, fueron de 220,6 kilogramos, que significa el 20,4 % de pérdidas de la producción anual por vacas por año (Figura 6). Una reducción de la producción de leche de 315 kg - 420 kg se informa en rebaños con alta infestación de *Fasciola hepatica* (Mezo *et al.*, 2011).

a a

b

Figura 6. Producción de leche por vaca por año en los rangos de densidad óptica relativa (ODR) que califica el productor del kit de ELISA (Sanovir *F.hepatica-Ab kit*). Letras diferentes indica diferencias significativas ($P < 0,05$, ANOVA, Student Newman Keuls). Barra T es la desviación estándar.

La relación de los valores de ODR, para cada una de las variables relacionadas con las características de la unidad, se muestra en la Tabla 1. Se observa diferencia significativa en la variable relacionada con la disponibilidad del pasto

en lluvia, para $p < 0,05$ con valor de 0,005. La variable tipo de producción privada (CCS) presenta valor de ODR mayor de 0,6 pero no mostró significación.

Tabla 1. Relación de las variables productivas con los niveles ODR

Variable			%	N	ODR	Desviación Estándar
Forma de producción	Estatal	UEB	20,8	16	0,572 ^b	0,206
		UBPC	40,3	28	0,516 ^b	0,167
	Privado	CPA	24,7	19	0,524 ^b	0,164
		CCS	14,3	11	0,667 ^b	0,188
Tipo de rebaño	Lechero		39	30	0,536 ^b	0,177
	Carne y leche		61	44	0,561 ^b	0,186
Área de la unidad	<=13,42 ha		76,6	56	0,561 ^b	0,190
	>13,42 y <=30 ha		10,4	8	0,493 ^b	0,128
	>30 ha		13	10	0,539 ^b	0,177
Proporción de número de vacas por hectareas?						
<1			35,1	27	0,555 ^b	0,143
1-2			64,9	47	0,549 ^b	0,201
>2			-	-	-	-
Origen del agua						
Pozo			-	-	-	-
Reserva natural			100	74	0,551 ^b	0,182
Disponibilidad del pasto en sequía						

-76-100%	23,4	18	0,468 ^b	0,212
-51-75%	33,8	26	0,515 ^b	0,138
-26-50%	42,9	30	0,594 ^b	0,172
Disponibilidad del pasto en lluvia				
-76-100%	37,7	26	0,492 ^b	0,187
-51-75%	35,1	27	0,582 ^b	0,193
-26-50%	27,3	21	0,625 ^a	0,141

^a significación para $p < 0,05$ ^b no hay diferencia

La variable disponibilidad del pasto en lluvia mostró diferencia significativa, en relación a los niveles de ODR en el rebaño, cuando el pasto se encuentra entre el 26 - 75 % del total del área de pastoreo. Los suelos de las unidades en estudio, por sus características, contribuyen a la permanencia de biotopos, donde puede sobrevivir, con las condiciones necesarias para su hábitat el hospedero intermediario (caracol). En estas condiciones se desarrollan las fases que dan lugar a la fase infestante del ciclo biológico de la *F. hepatica* y una vez liberadas permanecen en el pasto hasta llegar a infestar al animal durante el pastoreo. En rebaños lecheros, de cinco países de Europa, coincide que la disponibilidad del pasto en lluvia que se asocia a niveles altos de ODR en dichos rebaños (Bennema *et al.*, 2010). Gutierrez (2004) refiere que la mayor infestación por *F. hepatica* de los rumiantes tiene lugar durante el pastoreo.

La tabla 2 muestra la relación de los valores de ODR para cada una de las variables relacionadas con los parámetros de manejo. Los valores de ODR fueron superiores a 0,6 en las variables rehabilitación del pasto y frecuencia de pastoreo en lluvia.

Tabla 2. Relación de ODR con las variables de manejo

Variable		%	N	ODR	Desviación Estándar
Vacas Totales (vacas lactantes +Vacas secas):	<30	15,6	12	0,490 ^b	0,190
	30-60	44,2	31	0,553 ^b	0,178
	>60	40,3	31	0,572 ^b	0,184
Desparasitación					
Nunca		14,3	11	0,510 ^b	0,218
Con clínica de parasitismo		44,2	31	0,575 ^b	0,188
Tratamiento preventivo		41,6	32	0,540 ^b	0,164
Pastoreo de las vacas con otras especies					
Ovino y chivo		57,1	41	0,536 ^b	0,205
Caballo		20,8	16	0,601 ^b	0,129
Otros		22,1	17	0,543 ^b	0,161
Rotación					
Si		-	-	-	-
No		100	74	0,551 ^b	0,182
Frecuencia de pastoreo en lluvia					
Día y Noche		31,2	24	0,507 ^b	0,157
>6 h por día		63,6	46	0,557 ^b	0,184

<6 h por día	5,2	4	0,740 ^a	0,204
Frecuencia de pastoreo en seca				
Día y Noche	33,8	26	0,518 ^b	0,162
>6 h por día	59,7	43	0,558 ^b	0,188
<6 h por día	6,5	5	0,654a	0,217
Rehabilitación del pasto				
-sí, casi todo (50-100%)	33,8	26	0,520b	0,162
-Parcialmente (<50%)	59,7	46	0,505b	0,188
- No	6,5	5	0,639a	0,217
Frecuencia de chapea				
- Comienzo de la sequía	28,6	22	0,517 ^b	0,170
- Fin de la sequía	71,4	52	0,565 ^b	0,186
Alimento complementario en sequía				
Si	23,4	18	0,578 ^b	0,193
No	76,6	56	0,543 ^b	0,179
Alimento complementario en lluvia				
Si	44,2	34	0,493 ^b	0,174
No	55,8	40	0,597 ^b	0,177

a significación para $p < 0,05$ ^b no hay diferencia

La variable frecuencia de pastoreo en lluvia mostró significación cuando los animales pastan menos de seis horas al día. En esta época del año, producto a

las constantes precipitaciones se desbordan las fuentes de agua (lagunas, ríos, tranque, etc.) que se encuentran en el área de pastoreo de los animales y es arrastrado por la corriente de agua el estiércol acumulado en el pasto, esto trae consigo la contaminación del mismo y la infestación de los animales durante el pastoreo, con la fase infestante del parásito. Nuestros resultados coincide con lo planteado por (Khan y Maqboo, 2012) que en los meses de lluvia cambian las condiciones medioambientales (temperatura, humedad y precipitaciones) lo que favorece la salida de la cercaría de los caracoles, esto provoca en la ingestión de la metacercaria por el hospedero definitivo. Además estos animales posterior al pastoreo son estabulados y pueden contaminarse mediante la ingestión de forraje contaminados, con la fase infestante. Gutiérrez (2004) refiere que la infección de los animales puede ocurrir por la ingestión de forrajes contaminados con metacercarias. Bennema *et al.* (2010), en rebaños lecheros, del noreste de Europa obtuvieron asociación de esta variable con el incremento de ODR.

La contaminación de los pastos se reduce al ser rehabilitados, lo cual trae consigo una disminución de los niveles de ODR, al ser eliminada la fase infestante, que puede estar presente en el pasto y ser ingerida por el animal y llegar a su fase adulta. En nuestro estudio el incremento de los niveles de ODR estuvo asociado, a la no rehabilitación del pasto, por lo que la fase infestante permanece en el área de pastoreo al no realizarse la rehabilitación. Coinciden con los resultados del estudio realizado por Bennema *et al.*, 2011 en rebaños lecheros, en Bélgica, donde el incremento de los niveles de ODR se asociaron a la no rehabilitación del pasto.

La figura 6, muestra la relación entre el valor real de la producción de leche y el valor que se predice por red neuronal artificial. Se observa una relación lineal entre ambos valores. Con un residual menor de 250 en el 89 % de los casos y $r^2 = 0,613$ (Figura 7).

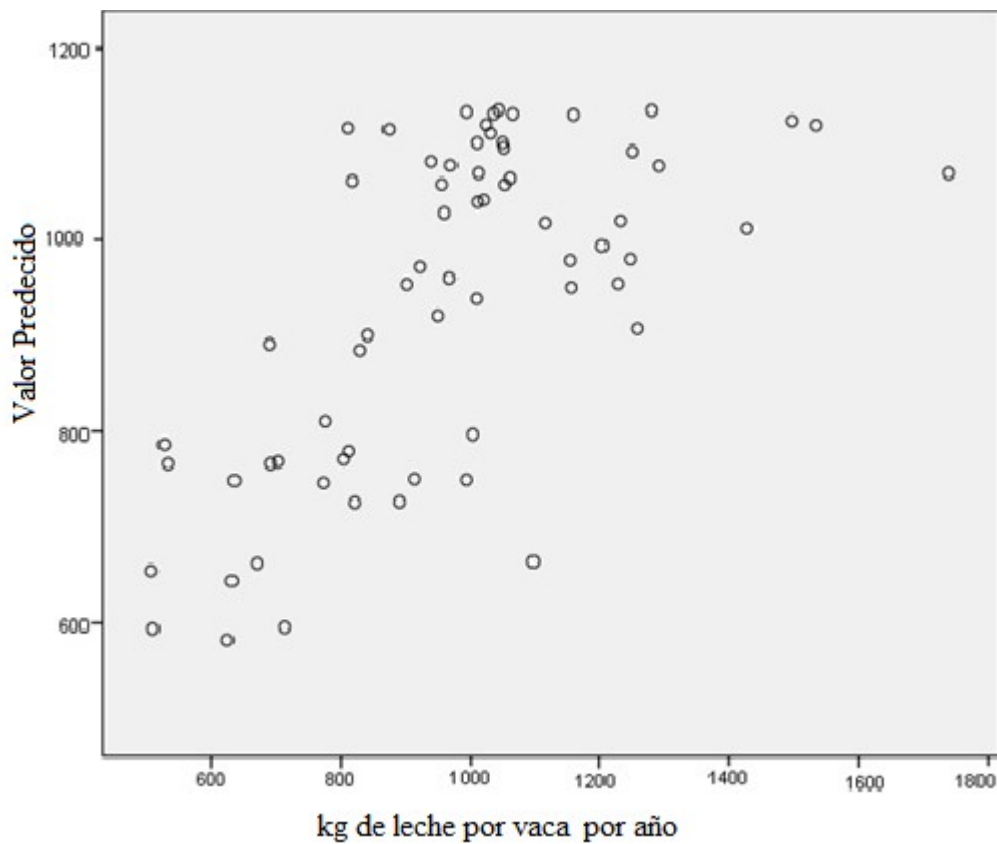


Figura 6 Relación de la producción de leche en los rebaños lecheros del municipio Vertientes y su predicción por red neuronal artificial MLP.

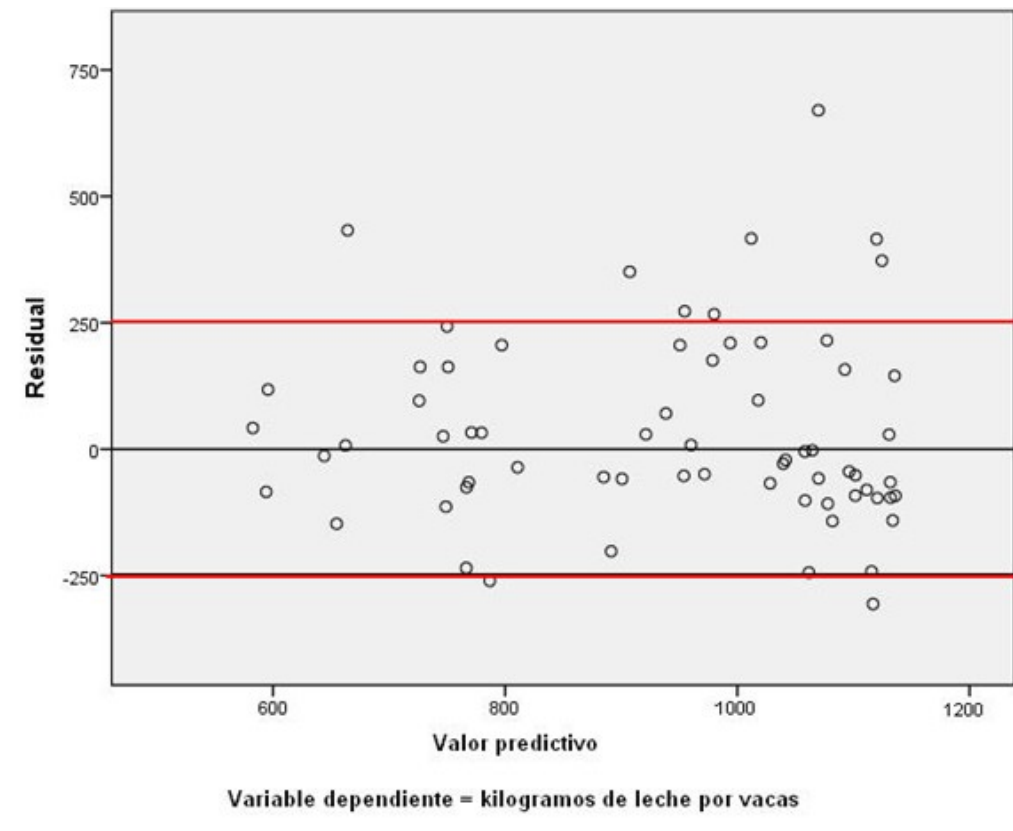


Figura 7 Valor residual estimado según la predicción de la producción de leche por vacas.

Las variables de mayor importancia para el modelo fueron las relacionadas con el ODR y las vacas lecheras (Figura 8). La presencia de altos niveles de ODR en el rebaño, repercute en la disminución de la producción.

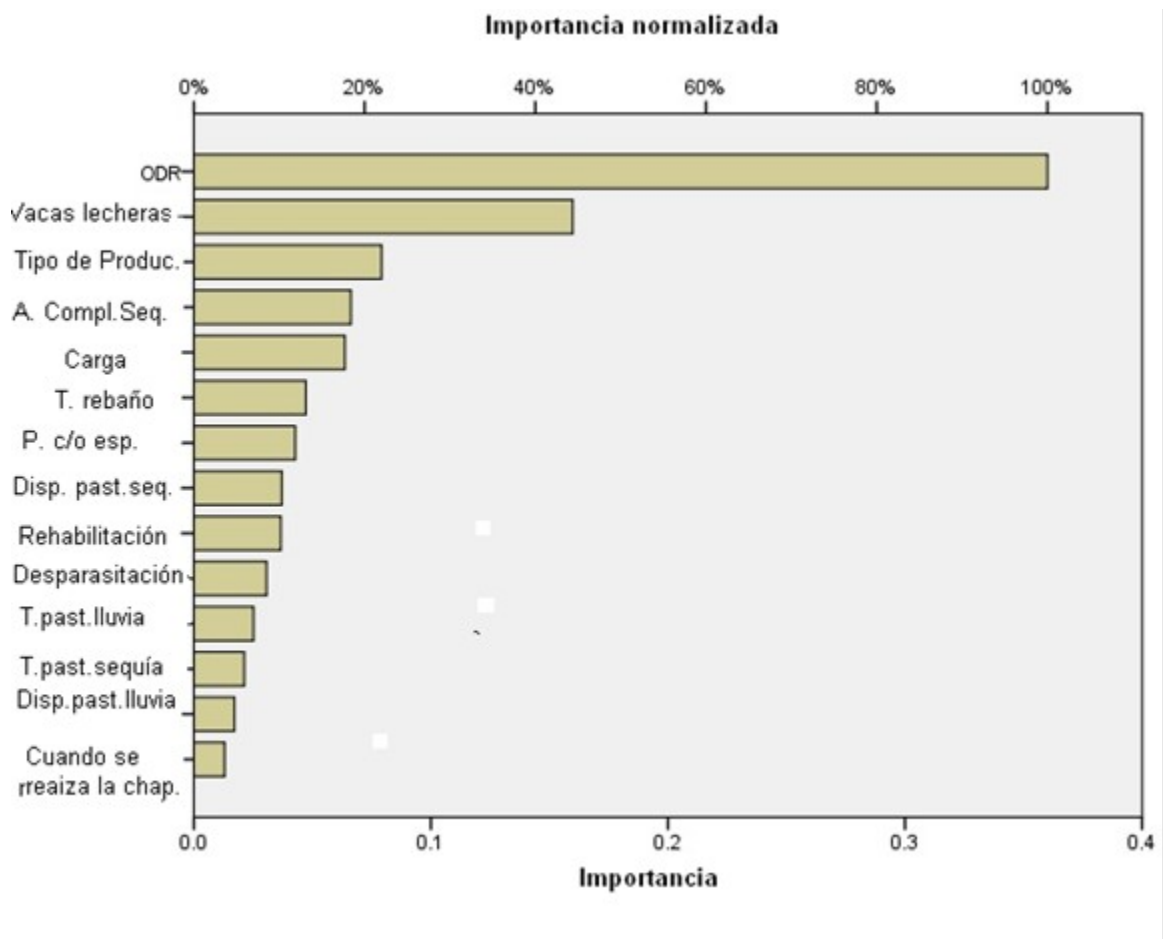


Figura 8 Importancia de las variables para el modelo de red neuronal artificial.

La figura 9, muestra la relación entre el valor real de ODR y el que se predice por red neuronal artificial. Se observa una relación lineal entre ambos valores. Con un residual menor del 0,2 en el 86,4 % de los casos, y $r = 0,496$ (Figura 10).

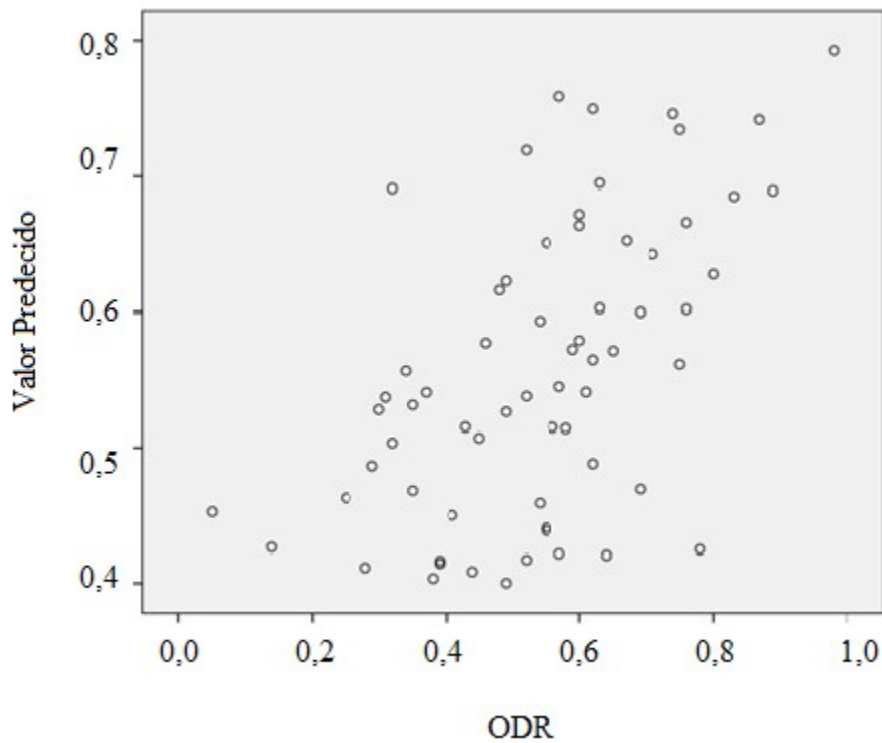


Figura 9 Relación del ODR en los rebaños lecheros del municipio Vertientes y su predicción por red neuronal artificial MLP.

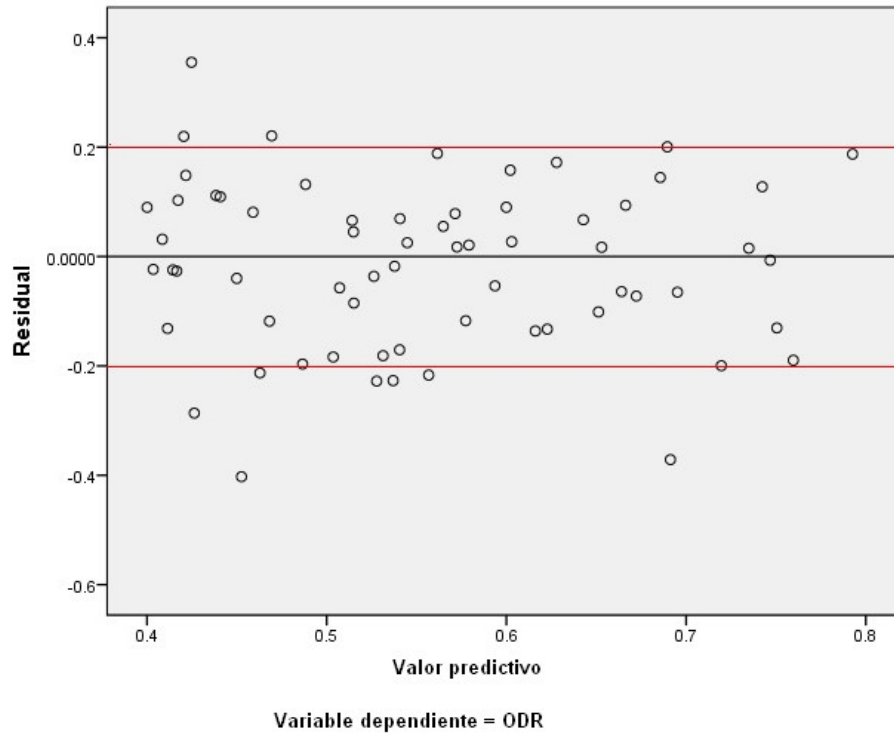


Figura 10 Valor residual estimados según la predicción de la producción de leche por vacas.

Las variables de mayor importancia en el modelo fueron las relacionadas con la frecuencia de pastoreo en lluvia, la rehabilitación del pasto y la alimentación complementaria en lluvia Figura 11. En estudio realizado por Bennema *et al.*, 2010, en cinco países del noreste de Europa, las variables que estuvieron asociadas a valores altos de ODR fueron la rehabilitación de pasto y el frecuencia de pastoreo en lluvia, lo que coincide con nuestro resultado. Ningún estudio demuestra la asociación de la alimentación complementaria con los valores de ODR.

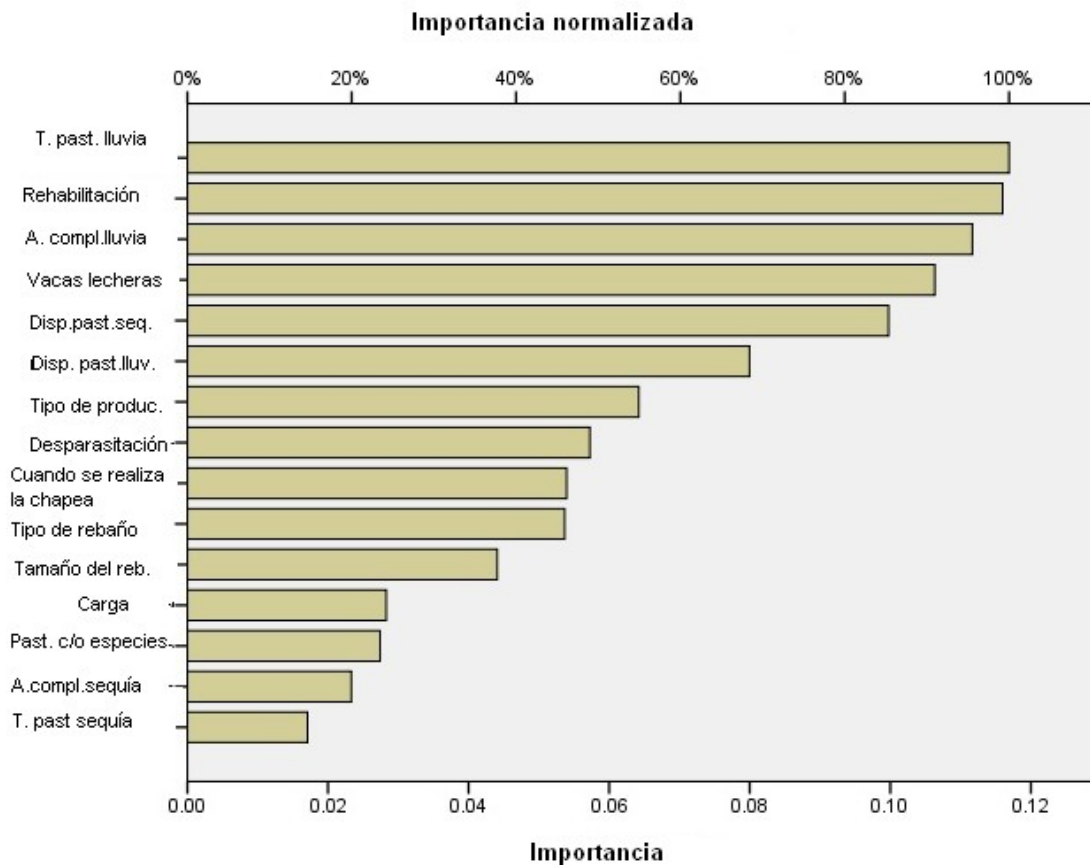


Figura 11 Importancia de las variables para el modelo de red neuronal artificial.

La asociación de la alimentación complementaria en lluvia con los valores de ODR.; en nuestra investigación mostró asociación, esto puede ser posible debido a que el alimento complementario suministrado al animal, puede estar contaminado por la fase infestante del parásito y al ser consumido por el mismo este puede infestarse. En entrevista con los productores, informaron que el alimento complementario que se suministra a los animales es el King-grass. Giraldo y Álvarez (2013) refieren que dentro de las especies de gramíneas, el *Pennisetum* sp (King-grass) es donde mayor población de caracol del género

Lymnea habitan. Para nuestro conocimiento este es el primer informe del empleo de redes neuronales (MLP) en la asociación de variables productivas con la infestación de *F. hepatica* en rebaños lecheros.

5. Conclusiones

- Los títulos de anticuerpos contra *F. hepatica* indican alta infestación en rebaños lecheros del municipio Vertientes.
- El incremento de los niveles de infestación de *F. hepatica* disminuye el rendimiento lácteo en los rebaños lecheros del municipio Vertientes.
- Las redes neuronales permitieron proponer modelos para la asociación de variables zootécnicas en la estimación de la producción de leche por vaca por año y del nivel de infestación de *F. hepatica* .

6. Recomendaciones

- Incluir un estudio geoestadístico que permita un análisis geográfico de distribución de *Fasciola hepatica*.
- Realizar estudios donde se incluyan los parámetros de calidad de la leche y las variables climáticas asociadas al aumento de los niveles de anticuerpos de fasciola.

Anexo 1. Información sobre las variables recogidas en el presente trabajo.

Nombre de la variable	Detalles	Fuentes de información
Municipio	Municipio	Cuestionario
Forma de producción	Estatal y Privada	Cuestionario
Tipo de rebaño	Lechero Doble propósito	Cuestionario
Area de la unidad	Tamaño de la granja	Propietario
Frecuencia de pastoreo en sequia	Pastoreo en sequia	Cuestionario
Alimentación complementaria en sequia	Forraje en sequia	Cuestionario
Disponibilidad del pasto sequia	Proporción del pasto	Cuestionario
Frecuencia de pastoreo en lluvia	Pastoreo en lluvia	Cuestionario
Alimentación complementaria en lluvia	Suplementación en lluvia (forraje)	Cuestionario
Disponibilidad del pasto en lluvia	Proporción del pasto	Cuestionario
Rehabilitación del pasto	Tipo de habilitación de pasto	Cuestionario
Frecuencia de chapean	Momento en que chapean	Cuestionario
Rotación	Rotación del pasto	Cuestionario
Pastoreo con otras especies	Especies que pastan junto a vacas lecheras	Cuestionario
Desparasitación	Cuando se realiza	Cuestionario
Fuente de agua	Fuente de agua utilizada	Cuestionario
Total de producción	Total de producción por año	Industria láctea
Vacas lecheras	Número de vacas lecheras en el	Propietario

	rebaño	
Total de Vacas.	Número de vacas en el rebaño.	Propietario
ODR	Densidad óptica relativa.	Análisis de laboratorio
Kilogramos por vaca	Producción lechera diaria por vaca.	Calculado con los datos obtenidos con el Propietario y la industria láctea.
Cantidad de animal	Talla del rebaño	Propietario
Carga	Vacas por hectáreas.	Propietario

Anexo 2. Modelo de cuestionario

1.Forma de producción	Estado	UEB	<input type="checkbox"/> 1
		UBPC	<input type="checkbox"/> 2
	Privada	CPA	<input type="checkbox"/> 3
		CCS	<input type="checkbox"/> 4

2. Tipo de rebaño	<input type="checkbox"/> Lechero <input type="checkbox"/> Lechero y carne	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
3. Tamaño del rebaño(vacas lactantes +Vacas secas)	<input type="checkbox"/> <10 <input type="checkbox"/> 10-30 <input type="checkbox"/> >30	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3
4. Densidad de vacas por hectáreas	<input type="checkbox"/> <1 <input type="checkbox"/> 1-2 <input type="checkbox"/> >2	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3
5. Promedio de producción de leche	<input type="checkbox"/> Por vaca por año <input type="checkbox"/> Por vaca por día	<input type="text"/> Kg <input type="text"/> Kg
6. hectáreas de la propiedad		<input type="text"/> ha
7. Tiempo diario pastas las vacas en sequía	<input type="checkbox"/> Día y noche <input type="checkbox"/> >6 horas por día <input type="checkbox"/> <6 horas por día	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3
8. Alimentación complementaria en la sequía	<input type="checkbox"/> Si (cuál) _____ <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
9. Disponibilidad del pasto en la época de seca	<input type="checkbox"/> -76-10% <input type="checkbox"/> -51-75% <input type="checkbox"/> -26-50% <input type="checkbox"/> -1-25% <input type="checkbox"/> -0%	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
10. Tiempo diario pastan las vacas en lluvia	<input type="checkbox"/> Día y Noche <input type="checkbox"/> >6 h por día <input type="checkbox"/> <6 h por día	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3
11. Alimentación complementaria en la lluvia	<input type="checkbox"/> Si (Cuál) _____) <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
12. Proporción del pasto o forraje en la época de lluvia	<input type="checkbox"/> -76-100% <input type="checkbox"/> -51-75% <input type="checkbox"/> -26-50% <input type="checkbox"/> -1-25% <input type="checkbox"/> -0%	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
13.Rehabilitación del pasto	<input type="checkbox"/> Chapea <input type="checkbox"/> -sí, casi todo (50-100%) <input type="checkbox"/> -Parcialmente <input type="checkbox"/> (<50%) <input type="checkbox"/> -No	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3
14.Frecuencia de chapea	<input type="checkbox"/> Comienzo de la sequía <input type="checkbox"/> Fin de la sequía	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2

	Comienzo de la época de lluvia Fin de la época de lluvia Nunca	<input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
15. Rotación de las vacas por cuarterones	Si No	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
16. Pastoreo de vacas con otras especies	Ovinos Cabras Caballos Puercos Otros (Cuál)_____)	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
17. Desparasitación	Nunca Solo cuando hay problemas de parasitosis Tratamiento preventivo Comienzo de la sequía Fin de la sequía Comienzo de la época de lluvia Fin de la época de lluvia Otros	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7
18. Fuente de agua	Pozo Estanque Acueducto	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3

Anexo 3

Modelo Sumario

	Errores relativos
Entrenamiento	0,547
Prueba	0,794

Validación	0,921
------------	-------

Variable dependiente=kilogramos de leche por vacas

Anexo 4

Modelo Sumario

	Errores relativos
Entrenamiento	0,740
Prueba	0,939
Validación	0,956

Variable dependiente=ODR

Anexo 5

Correlación

		ODR	Valores predictivos para ODR
	Correlación Pearson	1	.496**
ODR	Sig. (2-tailed)		.000

	N	74	74
--	---	----	----

7. Referencias bibliográficas

1. Abunna, F., Asfaw, L., Megersa, B., & Regassa, A. (2010). Bovine fasciolosis: coprological, abattoir survey and its economic impact due to liver condemnation at Soddo municipal abattoir, Southern Ethiopia. *Tropical animal health and production*, 42(2), 289-292.
2. Acha, P.N. y Szyfres, B. (2003). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales* (3a ed.). Washington: OPS.
3. Almazán, C., Ávila, G., Quiroz, H., Ibarra, F. & Ochoa, P. (2001). Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 97, 101-112.
4. Anderson, N., Luong, T. T., N.G.Vo, Bui, K. L., Smooker, P. M., & Spithill, T. W. (1999). The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *de revista*, 83, 15-24.
5. Arias, M., Hillyer, G.V., Sánchez, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Lomba, C., Díaz, P., Morrondo, P., Díez, P. & Paz, A. (2006). Da *Fasciola hepatica*-recombinant protein based ELISA test for the detection of current-ovine fasciolosis trickle infected. *Vet. Parasitol.* 137, 67-73.
6. Arroyo, R., Mora, J., Molina, S., Troper, L. & Amador, A. (1981). Fascioliasis hepática humana en Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 2, 35-57.
7. Barriga, O. (2002). *Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos de América Latina* (2ª ed.). Santiago de Chile: Germinal.
8. Bennema, S., Vercruysse, J., Claerebout, E., Schnieder, T., Strube, C., Ducheyne, E. y Charlier, J. (2009). The use of bulk-tank milk ELISAs to assess the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in dairy cattle in 11-Flanders (Belgium). *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 51-57. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.006>
9. Boulard, C., Bouvry, M. & Argente, G. (1985). Comparison of the detection of foci of fascioliasis by the ELISA test on lactoserum and serum and by coproscopy. *Ann. Rech. Vet.* 16, 363-368.

10. Bowman, D.D., Linne, R.C. y Eberhard, M.L. (2004). *Georgis Parasitología para veterinarios* (8a ed.). Madrid: Elsevier.
11. Brito, A. E. (2010). Prevalencia, decomisos de hígado y pérdidas económicas por *Fasciola hepatica* en mataderos bovinos de tres provincias de la región central de Cuba. *REDVET*, 11(04), 1-7. Recuperado de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040410/041006.pdf>
12. Carvalho, O. y Jannotti, L. (2008). *Moluscos Brasileiros de Importancia Médica*. Belo Horizonte: Laboratorio de Helmintología e Malacología Médica - Fundación Oswaldo Cruz.
13. Chalco Z. y Yesila, E. (2011). *Fasciolosis hepática en Humanos*. Recuperado de <http://www.monografias.com/trabajos73/fasciolosishepatica-humanos/fasciolosis-hepaticahumanos.html>.
14. Charlier, J., Duchateau, L., Claerebout, E., & Vercruysse, J. (2007). Predicting milk-production responses after an autumn treatment of pastured dairy herds with eprinomectin. *Veterinary Parasitology*, 143(3–4), 322-328.
15. Charlier, J., De Cat, A., Forbes, A., & Vercruysse, J. (2009). Measurement of antibodies to gastrointestinal nematodes and liver fluke in meat juice of beef cattle and associations with carcass parameters. *Veterinary Parasitology*, 166(3–4), 235-240.
16. Charlier, J., De Meulemeester, L., Claerebout, E., Williams, D., & Vercruysse, J. (2008). Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Veterinary Parasitology*, 153(1–2), 44-51.
17. Carrada, B. T. (2003). Fasciolosis: diagnóstico, epidemiología y tratamientos. *Rev Mex Gastroenterología*, 68(2), 35-42.
18. Carrada, B. T. (2007). *Fasciola hepatica*: Ciclo biológico y potencial biótico. *Rev Mex Patol Clin*, 54, (1), 21-27.
19. Carrada, T. y Escamilla, J. R. (2005). Fasciolosis: revisión clínico-epidemiológica actualizada. *Rev, Mex Patol Clin*. 52 (2), 83-96.

20. Conceição, M., Durão, R., Costa, I. y Correia, J. (2002). Evaluation of a simple sedimentation method (Modified McMaster) for diagnosis of bovine fasciolosis. *Vet Parasitol* 105, 337-343.
21. Cordero, M., Rojo, F.D., Martínez, A.R., Sánchez, M.C., Hernández, S., Navarrete, I...Carvalho, M. (1999). *Parasitología Veterinaria*. España: McGraw Hill Interamericana.
22. Cordero, M. y Rojo, F. A. (2002). *Parasitología Veterinaria* (3a ed.). Madrid: McGraw Hill. Interamericana.
23. Córdova, M., Reátegui, L., & Espinoza, J. R. (1999). Immunodiagnosis of human fascioliasis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1), 54-57.
24. Díaz, R., Garcés, M., Millán, L. M., Pérez, J. y Millán, J. C. (2011) *Cubana Medicina Tropical*, 63(3), 268-274.
25. Díez, P. (2011). *Fasciola y fasciolosis, un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la Parasitología con otras Ciencias: Discurso de ingreso como Académico de Número Academia de Farmacia de Galicia*. Santiago de Compostela: Centro de Impresión NINO.
26. Doménech, C.I., Marcet, S.R., Figueredo, P.M. y Sarracent, P.J. (2009). Conservación de heces humanas para la detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. *Rev Cubana Med Trop* 61(2), 1-5
27. Drugueri, L. (2005). *Distomatosis-fasciolosis-Fasciola hepatica-Fasciola gigantica*. ZOE Tecno-Campo Grande do Sul.
28. Duménigo, B. E., Espino, A. M., & Finlay, C. M. (1996). Detection of *Fasciola hepatica* antigen in cattle faeces by a monoclonal antibody-based sandwich immunoassay. *Research in veterinary science*, 60 (3), 278-279. Recuperado de [http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288\(96\)90055-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288(96)90055-7)
29. Dusak, A., Onur, M. R., Cicek, M., Firat, U., Ren, T., & Dogra, V. S. (2012). Radiological imaging features of *Fasciola hepatica* infection—A pictorial review. *Journal of clinical imaging science*, 2.

30. Espino, A. M. (1997). *Inmunodiagnóstico de la fascioliasis humana y su aplicación en brotes epidémicos*. (Tesis de doctorado inédita). IPK, La Habana, Cuba.
31. Espino, A.M., Marcet, R. & Finlay, C.M. (1997). *Fasciola hepatica*: detection of antigenemia and coproantigens in experimentally infected rats. *Exp. Parasitol.* 85, 117-120.
32. Estuningsih, S.E., Widjayanti, S., Adiwinata, G. & Piedrafita, D. (2004). Detection of coproantigens by sandwich ELISA in sheep experimentally infected with *Fasciola gigantica*. *Trop. Biomed.* 21: 51-56.
33. Fredes, F. (2004). La fascioliasis animal y humana. *Electr. Pat. Vet*, 1, 38-67.
34. Fox, N. J., White, P. C., McClean, C. J., Marion, G., Evans, A., & Hutchings, M. R. (2011). Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. *PloS one*, 6(1), e16126.
35. Giraldo, E. y Álvarez, L. (2013). Estudio de las plantas hospederas de *Lymnaea columella* Say, 1817, asociadas a humedales de un área endémica en *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) de la región central de la cordillera central colombiana. *REDVET Rev. Electrón. Vet*, 14(11B). Recuperada de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111113B.htm>
36. Girão, E. S. y Ueno, H. (1985). Técnica de Quatro Tamises para o Diagnóstico Coprológico Quantitativo da Fasciolose dos Ruminantes. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 20 (8), 905-912.
37. Gonzalo-Orden, J.M., Millán, L., Álvarez, M., Sánchez-Campos, S., Jiménez, R., González-Gallego, J. & Tuñón, M.J. (2003). Diagnostic imaging in sheep hepatic fascioliasis: ultrasound, computer tomography and magnetic resonance findings. *Parasitol. Res.* 90, 359-364.
38. Gorman, T., Moreno, P., Lorca, M., Ibarra, L. y Alcaíno, H. (1991). Inmunodiagnóstico de la fasciolosis animal mediante una prueba inmunoenzimática (ELISA). *Parasitol al Día*, 15, 87-93.
39. Gramajo, J. (2006). *Enfermedad parasitaria: Fasciolosis presente en la ganadería correntina*.

40. Gutiérrez, J. F. (2004). *Fasciolosis Bovina*. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria. Recuperado de www.produccion-animal.com.ar.
41. Instituto de Medicina Veterinaria de Cuba. (2007). *Reporte anual de fasciolosis bovina en Cuba*. La Habana.
42. Kahn, L.H., Kaplan, B. & Steele, J.H. (2007). Confronting zoonoses through closer collaboration between medicine and veterinary medicine (as 'one medicine'). *Vet. Ital.* 43, 5-19.
43. Khan, U.J., Maqboo, A. (2012). Prevalence of Fasciolosis in Cattle Under Different Managemental Conditions in Punjab. Pakistan, *J. Zool*, 44 (5), 1193-1196.
44. Keiser, J. & Utzinger, J. (2005). Emerging foodborne trematodiasis. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1507-1514.
45. Lazo, P.L., Francos, U., Calero, I. y Valdés, M.C. (2010). La vigilancia epizootiológica como garantía de la salud de la población animal en sistemas de producción integrados con promiscuidad de especies. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 11, (03b), 1695-7504. Recuperado de [http:// Rev. Salud Anim.trabajos12/paras/paras.html](http://Rev.Salud Anim.trabajos12/paras/paras.html).
46. Leguía, G. (1991). *Distomatosis hepática en el Perú: Epidemiología y Control*. Lima: Ciba Geigy Hoescht.
47. Levecke, B., Behnke, J. M., Ajampur, S. S., Albonico, M., Ame, S. M., Charlier, J... Kotze, A. C. (2011). A comparison of the sensitivity and fecal egg counts of the McMaster egg counting and Kato-Katz thick smear methods for soil-transmitted helminths. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(6), e1201.
48. López, L. y Acuña, A. M. (2011). Fascioliasis en la República Oriental del Uruguay. [s l.: s. n.].
49. Marcos, L., Maco, V., Terasima, A., Samalvides, F. y Gotuzzo, E. (2002). Prevalencia de parasitosis intestinal en niños del valle del mantaro. *Rev. Med Hered.* 13 (3), 85.

50. Marcos, L. A., Maco, V., Terashima, A., Samalvides, F., Miranda, E., Tantalean, M. .. Gotuzzo, E. (2004). Hiperendemicidad de Fasciolosis humana en el Valle del Mantaro, Perú: Factores de riesgo de la infección por *Fasciola hepatica*. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 24(2), 158-164.
51. Marcos, L. A., Terashima, A., Leguia, G., Canales, M., Espinoza, J.R. y Gotuzzo, E. (2007). La Infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una Enfermedad Emergente: Contribución especial. *Revista Gastroenterol*, 27, 389-396.
52. Marín, M.S. (1992). *Epizootiología de la fasciolosis bovina en Asturias. Identificación y expresión de un antígeno unitario* (Tesis inédita de doctorado). Universidad de Oviedo, Departamento de Biología Funcional, España.
53. Martínez-Valladares, M., Robles, D., Martínez, J.M., Cordero, C., Famularo, M.R., Fernández, N... Rojo, F.A. (2013). Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasit. Vectors* 6, 282.
54. Mas-Comas, S., Bargues, M.D. & Valero, M.A. (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35, 1255-1278.
55. Mezo, M., González-Warleta, M., Carro, C., & Ubeira, F. M. (2004). An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *Journal of Parasitology*, 90(4), 845-852.
56. Mezo, M., González, M. & Ubeira, F.M. (2007). The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *J. Parasitol.* 93, 65-72.
57. Molloy, J.B., Anderson, G.R., Fletcher, T.I., Landmann, J. & Knight, B.C. (2005). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Vet. Parasitol.* 130, 207-212.

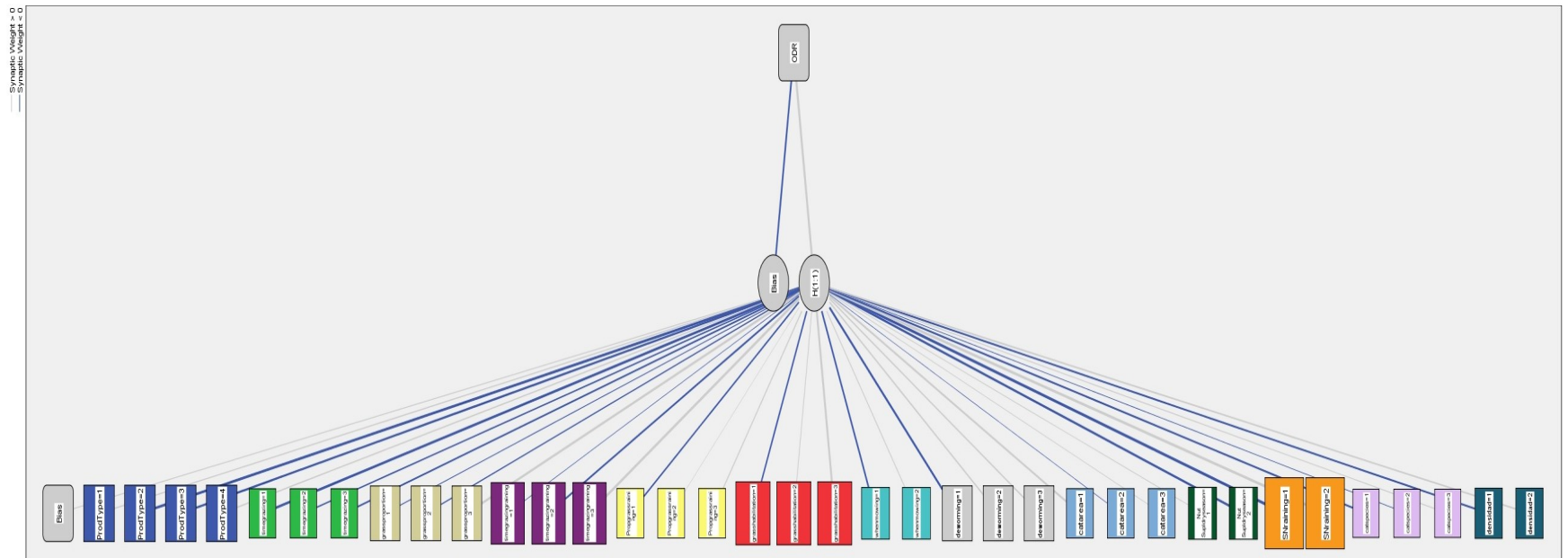
58. Moreira, C., Souza, S., Barini, A., Araújo, E., & Fioravanti, M. (2012). Serum γ -glutamyltransferase activity as an indicator of chronic liver injury in cattle with no clinical signs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64(6), 1403-1410.
59. Moustafa, N.E., Hegab, M.H. & Hassan, M.M. (1998). Role of ELISA in early detection of *Fasciola* copro-antigens in experimentally infected animals. *J. Eg. Soc. Parasitol.* 28, 379-387.
60. Nieves, E., Rondón, M., Zamora, E. & Salazar, M. (2005). *Fasciola hepatica* en la zona alta de Mérida, Venezuela. *Rev Elec Vet REDVET*, 6(12).
61. O'Neill, J., Johnston, R., Halferty, L., Brennan, G., Keiser, J., & Fairweather, I. (2009). Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: morphological changes in the tegument and gut following in vivo treatment with artemether in the rat model. *Journal of helminthology*, 83(02), 151-163.
62. Oprescu, I., Darabuș, G., Morariu, S., Mederle, N., Ilie, M.S., Imre, M... Onita, P. (2010). Immunological diagnosis of fasciolosis by ELISA method in sheep and cattle from Arad County. *Lucrari Stiintifice Med. Vet.* 43, 21-29.
63. Parffit, J. W. (1970). A method for counting *Fasciola* eggs in cattle faeces in the field. *Veterinary Record* 87, 180-182.
64. Pérez, J., Ortega, J., Bravo, A., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Moreno, T. & Martínez-Moreno, A. (2005). Phenotype of hepatic infiltrates and hepatic lymph nodes of lambs primarily and challenge infected with *Fasciola hepatica* with and without triclabendazole treatment. *Vet. Res.* 36, 1-12.
65. Pfister, K. (1990). Serodiagnosis of fasciolosis in ruminants. *Rev. Sci. Technol.* 9, 511-518.
66. Piñeiro, P. (2013). *Estudio de los posibles reservorios de la fasciolosis en Galicia* (Tesis inédita de doctorado). Universidad de Santiago de Compostela.
67. Pulido, V., Castañeda, A. P., Rubiela, S. y Arbelaez, G. (2011). *Fasciola hepatica*: Pedagogía del diagnóstico por laboratorio y su situación en Colombia. REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria*, 12 (5B). Recuperado de <http://veterinaria.org/revistas/redvet/n050511B/05112.pdf>.

68. Quiroz, H. R. (2000). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México: Uteha.
69. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, C.D. y Hinchchiff, K. W. (2002). *Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino* (9 a ed.). España: Mac Graw-Hill-Interamericana.
70. Ramajo, V., Oleaga, A., Casanueva, P., Hillyer, G.V. & Muro, A. (2001). Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Vet. Parasitol*, 97, 35-46.
71. Rapsch, C., Schweizer, G., Grimm, F., Kohler, L., Bauer, C., Deplazes, P., . . . Torgerson, P. R. (2006). Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, 36(10–11), 1153-1158. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.001>
72. Reichel, M.P. (2002). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Vet. Parasitol*. 107, 65-72.
73. Reichel, M. P., Vanhoff, K., & Baxter, B. (2005). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 129(1–2), 61-66. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.013>
74. Richter, J., Freise, S., Mull, R. & Millán, J. (1999). Fascioliasis: Sonographic abnormalities of the biliary tract and evolution after treatment with triclabendazole. *Trop. Med. Int. Health* 4, 774-781.
75. Rinaldi, L., Coles, G., Maurelli, M., Musella, V., & Cringoli, G. (2011). Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology*, 177(3), 345-352.
76. Rodríguez, M., Rojas, J. & Gómez, V. (1998). *Fasciola hepatica*: partial characterization of circulating antigens. *J. Parasitol*. 84, 1053-1055.

77. Rojas, C. M. (2004). *Nosoparasitosis de los Rumiantes Domésticos Peruanos* (2a ed). Lima: Maijosa.
78. Rojas, L., Vázquez, A., Domenech, I. y Robertson, L. J. (2010). Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends Parasitol*, 26 (1), 26-34.
79. Rojo, F. A. y Gómez, M. (1989). Historia y Etiología: Trematodosis hepáticas: Fasciolosis. *Bovis* 31, 13-16.
80. Salimi-Bejestani, M., Daniel, R., Felstead, S., Cripps, P., Mahmoody, H., & Williams, D. (2005). Prevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds in England and Wales measured with an ELISA applied to bulk-tank milk. *Veterinary record*, 156 (23), 729-731.
81. Santiago, N. & Hillyer, G.V. (1988). Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 74, 810-818.
82. Serrano, E. (2003). *Regulaciones establecidas para la protección de las unidades bovinas, bufalinas, ovino-caprinas, porcinas y equinas*. La Habana: Ministerio de la Agricultura.
83. Soulsby, E.J. (1993). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos* (7a ed.). México: Interamericana.
84. Thanh, N. T. G. (2012). Zoonotic fasciolosis in Vietnam: molecular identification and geographical distribution. Thesis Doctoral .Faculty of Veterinary Medicine university .Parasitology Department and mycology. 133. Disponible en: <http://www.vpi.ugent.be/page13/files/giang-thanh-nguyen-thi-2.pdf>
85. Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A.M. y Jennigs, F. W. (2001). *Parasitología Veterinaria* (2a ed.). Zaragoza: Acribia.
86. Valencia, N., Pariona, A., Huamán, M., Miranda, F., Quintanilla, S. y González, A. (2005). Seroprevalencia de fasciolosis en escolares y en ganado vacuno en la provincia de Huancavelica, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22 (2).
87. Vázquez, A., Sánchez, J., Pointier, J.P., Théron, A., & Hurtrez-Boussès, S. (2013, septiembre 12). *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different

isolates with two intermediate snail hosts: *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. *Journal of helminthology*, 1-7.

Anexo Red Neuronal para ODR



Anexo Red Neuronal para producción de leche por vaca por año

